

JP00/01269

PCT/JP00/01269

03.03.00

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

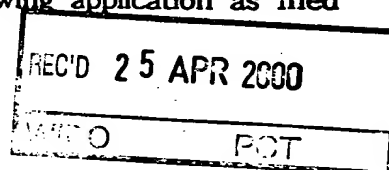
EJU

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1999年 3月12日



出願番号  
Application Number:

平成11年特許願第066551号

09/700187

出願人  
Applicant(s):

サントリー株式会社

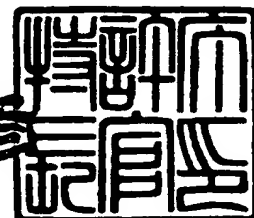
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 4月 7日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3023292

【書類名】 特許願  
【整理番号】 990410  
【提出日】 平成11年 3月12日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12N

【発明者】

【住所又は居所】 名古屋市千種区見附町1-14 見附もみじ苑A301  
【氏名】 佐々木 幸子

【発明者】

【住所又は居所】 名古屋市名東区よもぎ台2-913 パピヨンよもぎ台  
2F  
【氏名】 永野 幸生

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県知多郡阿久比町卯阪中野屋敷5  
【氏名】 稲葉 丈人

【特許出願人】

【識別番号】 000001904  
【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089705  
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル2  
06区 ユアサハラ法律特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 社本 一夫  
【電話番号】 03-3270-6641

【選任した代理人】

【識別番号】 100071124

【弁理士】

【氏名又は名称】 今井 庄亮

【選任した代理人】

【識別番号】 100076691

【弁理士】

【氏名又は名称】 増井 忠武

【選任した代理人】

【識別番号】 100075236

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗田 忠彦

【選任した代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

【選任した代理人】

【識別番号】 100092886

【弁理士】

【氏名又は名称】 村上 清

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9706781

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 光抑制性プロモーター

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1 に記載の配列をコア配列として含む DNA 断片であって、当該 DNA 断片の下流に設置される遺伝子の発現を光の存在下で抑制することを特徴とする DNA 断片。

【請求項 2】 配列番号 2 に記載の配列、あるいは当該配列中で配列番号 1 に記載のコア配列以外の部分において 1 個若しくは複数個の塩基が欠失、置換及び/又は付加された塩基配列を含む DNA 断片であって、その下流に設置される遺伝子の発現を光の存在下で抑制するシスエレメントである、請求項 1 に記載の DNA 断片。

【請求項 3】 配列番号 3 に記載の塩基配列からなる請求項 1 に記載の DNA 断片。

【請求項 4】 配列番号 1 に記載の塩基配列をコア配列として含むプロモーターであって、当該プロモーターの下流に設置される遺伝子の発現を暗所で促進するが、光の存在下で抑制することを特徴とするプロモーター。

【請求項 5】 配列番号 2 に記載の配列、あるいは当該配列中で配列番号 1 に記載のコア配列以外の部分において 1 個若しくは複数個の塩基が欠失、置換及び/又は付加された塩基配列を含む請求項 4 に記載のプロモーター。

【請求項 6】 配列番号 3 に記載の塩基配列からなる請求項 4 に記載のプロモーター。

【請求項 7】 構成的に発現するプロモーター配列を下流に結合した、請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の DNA 断片。

【請求項 8】 構成的に発現するプロモーターを下流に結合した、請求項 4 ないし 6 のいずれか 1 項に記載のプロモーター。

【請求項 9】 構成的に発現するプロモーターがカリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーターである請求項 7 に記載の DNA 断片。

【請求項 10】 構成的に発現するプロモーターがカリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーターである請求項 8 に記載のプロモーター。

【請求項 1 1】 請求項 1 ないし 1 0 のいずれかに記載の DNA 断片もしくはプロモーターの下流に遺伝子を結合した DNA 断片からなり、該遺伝子の発現が光によって抑制されることを特徴とする発現カセット。

【請求項 1 2】 請求項 1 1 に記載の発現カセットまたは該カセットを含む DNA 断片で形質転換された植物細胞。

【請求項 1 3】 請求項 1 1 に記載の DNA 断片で形質転換された植物またはその子孫、および該植物またはその子孫の植物体の一部。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は植物において、目的遺伝子の発現を暗所で活性化するため、または該目的遺伝子の発現を明所で抑制するためのプロモーターに関するものである。また、本発明は該光抑制性プロモーターを用いて、植物での遺伝子発現を明暗によって制御する方法に関するものである。より詳しくは、エンドウ由来の低分子量 G タンパク質遺伝子の光抑制性プロモーター、および該プロモーターの利用方法に関するものである。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

植物を含む真核生物の遺伝子発現制御機構は以下のように理解されている（経塚、植物の形を決める分子機構、p107-117、秀潤社、1994年）。生物の各遺伝子は、生物の生活史の様々な場面において、遺伝的に厳格に規定された発現パターンをもつ。また、個々の遺伝子が正しい発現パターンを示すおかげで、生物は個体としての機能を維持できている。組織特異的発現（空間的・時間的に制御された発現）は、遺伝子発現の重要な制御の一つである。特に個体の発生、形態形成、成長においては、定められた遺伝子（群）の組織特異的発現が、パターンの維持とさらにひき続く過程を遂行するための基礎的な情報となっていく。

【0 0 0 3】

遺伝子発現制御には、転写レベルとそれ以降の段階で起こるものの両方があるが、前者が一般的であり、研究も進んでいる。転写レベルでの発現制御では、遺

伝子の発現パターンを決定する情報のほとんどは、転写される領域の5'側にあるプロモーター領域にあるとされている。プロモーターは、遺伝子の転写の開始部位を決定し、またその頻度を直接的に調節するDNA上の領域である。ここにRNAポリメラーゼあるいは転写因子が結合することにより機能する。タンパク質をコードする遺伝子はすべてII型のRNAポリメラーゼによって転写される。

## 【0004】

プロモーター中にはさまざまなシスエレメントがあることが多い。シスエレメントは、転写領域を含むDNA分子と同一分子上にある遺伝子の転写活性に影響を与える領域である。多くの遺伝子のプロモーターにおいて、(1) ポジティブ/ネガティブに働くシスエレメントが存在する、(2) ある特定の組織（例えば、種子、葉、花粉など）での特異的転写に対しても、複数の組織特異的シスエレメントをもつ場合が多く、それらが独立にあるいは相互に関係しながら転写パターンおよび転写量を決定している、(3) それぞれの遺伝子のプロモーター上には複数のシスエレメントがモジュラーとして存在し、それらの機能の最終的な総和として、その遺伝子に固有の組織特異的転写パターンが決定されている、などのことがわかってきている。

## 【0005】

植物において遺伝子組換え技術が確立して以来、多くの形質転換植物が商業化されている。これらの形質転換植物に導入した外来遺伝子の発現を制御するプロモーターには、一般にカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター、ノバリンシンターゼプロモーターなどの構成的に発現するプロモーターが用いられてきた。しかし、外来遺伝子を構成的に発現させることは、形質転換植物自体への悪影響、いわゆるペナルティーを惹起することが懸念される。上記のように植物を含む真核生物の遺伝子発現は組織、時期、外部環境などによって制御されているが、このような遺伝子の転写制御部位（プロモーター）を有用な外来遺伝子の上流に挿入して発現カセットを作製し、この発現カセットを植物に導入すれば、外来遺伝子を適切な組織、時期、環境において発現させることができる。このことを実現するためには、目的の遺伝子を適切な組織、時期、環境において発現させるプロモーターが必要となる。外来遺伝子を組織特異的に発現させることは産業

上有用である。たとえば、植物体の食用部分で外来遺伝子を発現しないように制御できれば、安全性へのリスクを低減でき、パブリックアクセプタンスを得やすくなる。

#### 【0006】

光による遺伝子の発現制御は植物の形態形成および成長にとってきわめて重要であるが、光によって転写が活性化される、あるいは光によって転写が抑制される遺伝子がある。このような光制御性遺伝子のプロモーター領域を取得し、このプロモーターを外来遺伝子上流に連結して光制御性発現カセットを作製し、この光制御性発現カセットを植物に導入すれば、その植物体において外来遺伝子の発現を光によって制御することができる。このように光によって外来遺伝子の発現を制御することにより、構成的に発現させることによって生じる形質転換植物自体への悪影響を回避することができる。

#### 【0007】

植物は発芽すると地中で急激に茎が伸び、地表に出て光があたるとその伸長が止まって、葉を展開させて光合成を開始する。これらの変化の多くは光受容体を介した遺伝子発現調節により制御されている。エンドウ由来の低分子量Gタンパク質遺伝子 $pra2$  (Nagano et al. 1993 Plant Cell Physiol. 34:447-455) は光受容体のフィトクロムによって制御されている (Yoshida et al. 1993 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 6636-6640)。 $pra2$ 遺伝子はエンドウ上胚軸伸長部位に発現しており、光によりその発現が抑制されることから、暗発芽時の茎の伸長に関与していると考えられている。

#### 【0008】

これまでに光によりその発現が活性化される、すなわちフィトクロムにより正の制御を受ける数多くの遺伝子が報告されている。例えば、エンドウ由来のリブローズ1,5-2リン酸カルボキシラーゼ小サブユニット $rbcS$  (Sasaki et al. 1983 Eur. J. Biochem. 133:617-620)、アオユキクサ由来の集光性クロロフィルタンパク質 $Lhcb$  (Kehoe et al., 1994 Plant Cell 6:1123-1134) などがある。それらのいくつかについては、転写制御に関わるトランスエレメントとなる転写因子が詳細に解析されてきた (Terzaghi and Cashmore, 1995, Annu. Rev. Plant

Physiol. Plant Mol. Biol. 46, 445-474)。さらに、これらのシスエレメントを含むプロモーターを利用して、植物体において外来遺伝子の発現を光によって正に制御すること、すなわち光によって転写・発現を活性化することも行われている。例えば、上記rbcSの3Aプロモーターの下流にサイトカイニン合成遺伝子iptをつなぎ、タバコに導入したところ、サイトカイニンの合成が光誘導的に起こった(Thomas J.C. et al. 1995 Plant. Mol. Biol. 27: 225-235)という報告がある。

#### 【0009】

しかし、フィトクロムにより負の制御を受ける遺伝子、すなわち、フィトクロムによって転写・発現が抑制される遺伝子の報告は少なく、その制御に関わるシスエレメントの報告はほとんどない。フィトクロムA遺伝子、PHYHのプロモーターはよく解析されており、フィトクロムにより抑制されるシス因子であるRE1因子が同定されてはいるが(Bruce et al. 1991, EMBO J. 10:3015-3024)、シスエレメントまでは同定されていない。大豆の $\beta$ チューブリン遺伝子であるtubB1(Tonoike et al. 1994, Plant J. 5: 343-351)、アスパラギンシンターゼであるAS1(Nagai et al. 1997, Plant J. 12: 1021-1034)、アラビドプシスのホメオボックス遺伝子の一つであるAthb2(Carabelli et al. 1996, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93: 3530-3535)も光で抑制される遺伝子であることがわかってはいるが、そのプロモーターの詳細な解析はされていない。

#### 【0010】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、明所で遺伝子の発現を抑制するが、暗所で遺伝子の発現を活性化するプロモーターおよび、明所でプロモーターによる遺伝子の発現を抑制するが、暗所でプロモーターによる遺伝子の発現を活性化するのに必要なシスエレメント配列を提供する。

本発明はまた、該プロモーターおよび／またはシスエレメントによって、光によって外来遺伝子の発現を抑制する、ないしは暗所で外来遺伝子の発現を活性化する方法を提供する。

また、本発明は該光抑制性プロモーターおよび／またはシスエレメントを用い



て、暗所で目的遺伝子を特異的に発現するための発現カセット、該発現カセットを組み込んだ植物を製造するための発現ベクター、および該発現ベクターで植物を形質転換して、好ましくはそのゲノム中に目的遺伝子を導入することによって、該目的遺伝子が暗所で特異的に発現するように制御された形質転換植物も提供する。

#### 【0011】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは暗所で特異的に発現する植物由来の遺伝子を鋭意研究した結果、エンドウ由来の低分子量Gタンパク質遺伝子pra2の5'-非翻訳領域に、暗所でpra2遺伝子の発現を活性化する機能、すなわち光抑制性プロモーター機能があることを見いだした。該光抑制性プロモーターを詳細に解析した結果、該プロモーター中の93 bpの塩基配列が光抑制性のシスエレメントであることがわかり、該シスエレメント中に存在する12 bpのコア配列が光抑制的発現に必須の配列であることを見いだした。さらに、これらのコア配列あるいはシスエレメントを含むプロモーター（該光抑制性プロモーターであっても、別の構成的プロモーターとの組み合わせであってもよい）を目的遺伝子上流に挿入することによって、該目的遺伝子の発現が暗所で活性化され、明所で抑制されることを確認して、本発明を完成した。

#### 【0012】

従って本発明は、明時に遺伝子の発現を抑制し、暗時に遺伝子の発現を活性化する光抑制性プロモーターおよび／またはシスエレメント配列を提供する。

より具体的には、本発明は、配列番号1または2の塩基配列をシスエレメントとして有し、下流に設置した遺伝子の発現が光によって抑制されること、または暗所で該遺伝子の発現が活性化することを特徴とするプロモーター、および／またはシスエレメント配列、および該プロモーターまたはシスエレメント機能を有するDNA断片を提供する。本明細書により開示する配列番号1に記載の12塩基対の配列、該12塩基対の配列を含む配列番号2に記載の93塩基対の配列、および該93塩基対の配列中で上記12塩基対の配列以外の部分で1個若しくは複数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加により修飾された配列は、光によって発現が抑制さ

れるために必要なシスエレメントないしはシス因子である。従って、請求項1から請求項6までに記載のDNA断片ないしはプロモーターを含有するものは、すべて本発明の範囲に含まれる。なお、ここで光とは可視光のことをいい、赤外線や紫外線は含まない。

#### 【0013】

本発明の光抑制性プロモーターは、その下流に設置される種々の遺伝子の発現を、光の有無に基づいて制御できる。しかし、必要であれば、本発明の光抑制性プロモーターは、光による発現の制御を必要とする遺伝子に本来付随するプロモーター、あるいは他起源のプロモーターと一緒に用いてもよい。そのようなプロモーターとしては、構成的発現プロモーターが好ましい。なお、ここでいう構成的発現とは、例えば光の有無など、環境条件にかかわらず、常に発現しているという意味である。従って、本発明はまた、上記の光抑制性プロモーターまたはそのシスエレメントと、構成的発現プロモーターを組み合わせ、目的遺伝子の発現を光抑制的に制御するプロモーターも提供する。構成的発現プロモーターとしては、種々のものが本発明の目的に利用できる。例えば、植物細胞中で遺伝子を発現させるために使用されるプロモーターとして、例えば、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターやノパリンシンターゼプロモーターなどがある。しかしながら、構成的発現プロモーターは、必ずしもこれらに限定されない。植物細胞以外の宿主、例えば、緑藻類などのフィトクロムを有する宿主で遺伝子を発現させるための構成的発現プロモーターも、上記の光抑制性プロモーターまたはそのシスエレメントと組み合わせ使用することにより、宿主による遺伝子産物の生産を光によって制御することが可能である。

#### 【0014】

本発明は、上記の光抑制性プロモーターまたはシスエレメントの下流に目的遺伝子を設置し、該目的遺伝子を光抑制的に、ないしは暗所で誘導的に発現させる、光抑制的発現カセットも提供する。このようなカセットは、さらに、リボソーム結合部位、エンハンサー、ターミネーター等の目的遺伝子の発現のために有用な他の配列を含んでもよく、さらには、目的遺伝子に本来伴うプロモーター、あるいは外来のプロモーターを、上記光抑制性プロモーターまたはシスエレメント

の下流に含んでもよい。発現カセットは、適当な発現ベクターに組み込んで、細胞の形質転換に使用することができる。発現カセットまたは発現ベクターは、目的遺伝子で形質転換された細胞の選択を容易にするための選択マーカー、例えば抗生物質耐性遺伝子を含んでいてもよい。形質転換に特に適する細胞は、植物細胞である。

本発明はさらに、上記の光抑制的発現カセットで形質転換した植物細胞、該形質転換細胞を培養して再生させた組換え植物も提供する。発現カセットで植物細胞を形質転換し、目的遺伝子を植物細胞の染色体に安定に組み込む方法は、パーティクルガン法、アグロバクテリウム法等がよく知られている。形質転換した植物細胞を、植物用の培地でカルスに育て、さらにカルスから完全な植物体に増殖させる方法は、よく知られている。また、得られた植物体から交配によって安定な形質転換体を品種として固定させる方法もよく知られている。

#### 【0015】

本発明の発現カセットを用いて、農作物を形質転換すれば、例えば、暗所保存中に農作物の品質向上や劣化防止を達成することができる。例えば、

1. エチレンあるいはその前駆体を分解する酵素をコードしている遺伝子を本発明のシスエレメントまたはプロモーターに結合し、発現カセットとして植物工場生産する野菜に導入することにより、収穫後暗所に貯蔵した状態のときのみエチレンの生産を抑制して、野菜の過剰な成長や成熟が防止できる。
2. 特定のタンパク質アレルゲンを分解するプロテアーゼを稲や麦等の作物で発現させ作物中のアレルゲンを除去することができる。
3. チオレドキシンを発現させ、作物中の蛋白のS-S結合を組換えてアレルゲン性を除去することができる。
4. セルラーゼ遺伝子を発現させ、作物の栄養価を高め、消化の良い食品素材を提供することができる。
5. アミラーゼ遺伝子を野菜や果樹で発現させ、野菜、果実の澱粉を分解させて甘みを付与することができる。
6. ミトコンドリアでの呼吸を抑制し、野菜などの品質劣化を防ぐことができる。

7. 殺虫活性蛋白を農作物中で発現させ、収穫後の作物を虫害から守るなどが考えられる。

8. ルシフェラーゼ遺伝子を用いて暗闇で光る植物を作製することができる。

9. 夜間に芳香がする植物を作ることができる。

などの用途もあるが、これらに限定されるものではない。

# 【0016】

以下、本発明をさらに詳しく説明する。

光によって遺伝子の発現が抑制される、あるいは暗所で遺伝子の発現が活性化するという現象は、その遺伝子上流領域にあるプロモーターによって制御されている。本発明者らは、光でその発現が抑制される遺伝子上流領域を取得し、この上流領域の機能を詳細に解析して光抑制性の遺伝子発現に関わるシスエレメントの配列を同定すれば、本発明の課題である光抑制性プロモーターを得ることができると考えた。

そこで、エンドウ由来低分子量Gタンパク質遺伝子pra2のcDNA遺伝子をプローブとしてエンドウの染色体遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることにより、pra2の染色体遺伝子を取得した（実施例1参照）。このpra2染色体遺伝子には、2325塩基対からなる5'-非翻訳領域が存在することがわかった。さらに、プライマーエクステンション法によって転写開始点を解析した結果、pra2 mRNAには196塩基対の5'-非翻訳領域が存在し、このpra2染色体遺伝子には2129塩基対の転写制御領域（プロモーター領域）が存在することが分かった（実施例1、図1参照）

# 【0017】

発明者らは、この2325塩基対の5'-非翻訳領域の下流にレポーター遺伝子を接続したDNA断片を、パーティクルガンでエンドウ植物体に導入しレポーター遺伝子の発現を解析することにより、この5'-非翻訳領域が光抑制的に遺伝子発現を制御していること、すなわち光抑制性プロモーター機能があることを見いだした（実施例2参照）。次に、この5'-非翻訳領域の各種欠失クローンを作製して、上記の方法で植物体での光抑制的発現を解析することにより、配列番号2に記載の93塩基対の配列が光抑制的発現に関わるシスエレメントであることを見いだし

た（実施例 3、4 参照）。発明者らはまた、該シスエレメントを他のプロモーターと組み合わせたプロモーターも光抑制的に遺伝子の発現を制御することも見いだした（実施例 5、6 参照）。発明者はさらにリンカースキャン法およびゲルシフト法により、該シスエレメント中に存在する配列番号 1 に記載の 12 塩基対からなるコア配列が、光抑制的発現に必須の領域であることを見いだした（実施例 7、8 参照）。

【0018】

#### 【実施例】

以下実施例に従って、発明の詳細を述べる。分子生物学的手法は特に断らない限り、Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989) に依った。

#### 実施例 1. pra2 染色体遺伝子の単離と転写開始点の決定

pra2 cDNA (Nagano et al. 1993 Plant Cell Physiol. 34:447-455) をプローブとして用い、エンドウ染色体遺伝子ライブラリー（ストラタジーン社）を Nagano らの方法 (Nagano et al. 1993 Plant Cell Physiol. 34:447-455) でブラークハイブリダイゼーションを行うことにより、pra2 染色体遺伝子クローンを単離した。pra2 染色体遺伝子の塩基配列を図 1 に示した。染色体遺伝子には 2 つのエクソンと 1 つのイントロンがあった。染色体遺伝子から推定されるアミノ酸配列は cDNA から推定されるアミノ酸配列 (Nagano et al. 1993 Plant Cell Physiol. 34:447-455) と一箇所では異なっていた。すなわち cDNA では 206 番目がグリシンであったが、染色体遺伝子ではアラニンであった。これは、染色体遺伝子と cDNA 遺伝子の単離に用いたエンドウの品種が異なるためと考えられる。

【0019】

次に、プライマー・エクステンション法 (Nagano et al. 1991 Curr. Genet. 20, 431-436) により転写開始点を決定した。プライマーとしては塩基配列 5'-ACGGTTGTTGAATTACCGGTGTTAATAGAG-3' を持つプライマーを化学合成した。<sup>32</sup>P-ATP で標識した合成プライマーと 1.1  $\mu$ g の polyA<sup>+</sup> RNA とをハイブリダイズし、スーパースクリプト II (Gibco BRL 社) を用いた逆転写を行った。生成物を電気泳動してその塩基配列を解析した結果、染色体遺伝子は 196bp の 5'-非翻訳領域を持つことが明らかになった (図 1)。推

定されるTATA boxは翻訳開始点より上流24bpに位置することが示された。

# 【0020】

## 実施例2. トランジェント・アッセイ系の確立

エンドウ (*Pisum sativum* cv. Alaska, 雪印種苗社) を直径 14 mm のポット中、暗所で播種し、暗所で5-6日間栽培した。この植物体をパーティクルガン (bombardment装置、Model GIE-III, 田中社) 中に水平に置いた。この装置についてはすでに竹内らによって記載されている (Takeuchi et al. 1992, Plant Mol. Biol. 18:835-839)。黄化茎の成長部分 (先端から0.1 cm) に対し、径1.5-3  $\mu$ m の金粒子を打ち込んだ。金粒子は、*pra2*プロモーター (5'-上流領域2325bp、すなわちmRNAの5'-非翻訳領域196 bpとその上流領域2129 bpを含む) 制御下のルシフェラーゼ遺伝子、及びカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター制御下の $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を、それぞれ含むプラスミドDNAでコートした。GUS遺伝子は、遺伝子導入効率の差を標準化するため、内部標準として同時に導入した。5  $\mu$ gの各プラスミドを2 mgの金粒子と混合し、200  $\mu$ lのエタノールに懸濁した。うち4  $\mu$ lを1回の打ち込みに使用した。すべての操作は暗室にて行なった。

# 【0021】

打ち込み後、植物体を25℃、12時間の暗条件あるいは明条件 (70  $\mu$ mole/m<sup>2</sup>/secの白色光) 下に置いた。遺伝子導入した茎を液体窒素中で細かく砕き、粉末を300  $\mu$ lの100 mMリン酸カリウム (pH7.8)、1 mMジチオスレオトール、1%トロンX-100、1 mM EDTAに懸濁した。15,000 x gで4℃、5分間遠心した後、上清を-80℃で凍結し、ルシフェラーゼ活性を測定するまで保存した。ルシフェラーゼ活性測定は、Millerらの方法 (Millerら1992) に基づいたピカジーンルシフェラーゼ測定キット (和光純薬社) を用いて行なった。ルシフェラーゼによる光子の測定には、AUTO LUMAT (Berthold社) を用いた。GUS活性は、4-methyl umbelliferyl  $\beta$ -D-glucuronide (和光) を基質として用いる方法 (Jefferson et al. 1987, EMBO J.6, 3901-3907) により行ない、生じた4-methyl-umbelliferone濃度の測定にはFluoroskan II (Labosystems社) を用いた。ルシフェラーゼ活性は、内部標準として導入したGUS活性に基づき校正した。

## 【 0 0 2 2 】

レポーターであるルシフェラーゼの植物体中での活性を調べた結果、ポットで生育させたエンドウでは光の有無によつての活性に明らかに差があることが示された（図2a）。すなわち、ルシフェラーゼは、遺伝子導入後暗所で栽培した植物体で、明所で栽培した植物体よりも約3倍程度強く発現していた。さらに、茎の異なった部位に同じプラスミドを導入したところ、茎伸長部位で最もルシフェラーゼ活性が高いことが明らかになった（図2b）。以上の結果から、pra2遺伝子の5'上流領域は明条件下でレポーター遺伝子の発現を抑制すること、及びこの抑制効果は茎伸長部位に特異的であることが示された。

## 【 0 0 2 3 】

実施例 3. 5'上流領域欠失クローンの作製

pra2遺伝子5'上流領域（2129 bp）の光抑制に関わるシス領域を決定するため、さまざまな欠失クローンを以下の方法で作製した。

（方法1）pra2遺伝子の5'上流領域を、5'端にHindIII認識配列を含む一連の上流領域プライマーとpra2遺伝子の開始コドンATGに対応したNcoI認識配列を含むプライマー（NcoIプライマー：5'-GGTCCATGGTCTTGTCAAGATC-3'）を用いて増幅した。リンカースキャニング欠失クローンは、上流領域プライマーの内部にPstI認識配列に相当する6塩基の変異を導入したプライマーを用いた（LSコンストラクト）。増幅した断片は、pZER0-2.1（Invitrogen）のEcoRV部位にサブクローニングし、HindIIIとNcoIで消化した。HindIII-NcoI断片を電気泳動で分離し、DNA抽出キット（ファルシア）により目的のDNA断片を回収した。ルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミドpBI221-LUC（植物の細胞を観る実験プロトコル、p 199-200、秀潤社に記載）をHindIIIとNcoIで消化したDNA断片と、回収したDNA断片のそれぞれを結合した。サブクローニングしたDNA断片はその塩基配列を決定し、pra2遺伝子5'上流領域の該当部分の配列と一致することを確認した。上記の方法1によつて、PL1（5'-GGGAAGCTTTAAAGGCAAGGG-3'とNcoIプライマーで増幅）、PL3（5'-ACGTAAAGCTTAAAAATTACCCC-3'とNcoIプライマーで増幅）、PL4（5'-AAATAAAGCTTAAAAGTAACACATA-3'とNcoIプライマーで増幅）、PL4B（5'-AAATAAAGCTTAAAAGTAACACATA-3'と5'-GTACTGCAGTCAGACATGATTAACAAG-3'で増幅）、PL5（5'-AAAGAAGCTT

GGTAGCCCAAACAA-3' と NcoI プライマーで増幅)、LS1 (5'-AAGCTTctgcagGGATTTTACAGTAATAAAA-3' と NcoI プライマーで増幅)、LS2 (5'-AAGCTTGTCTGActgcagTACAGTAA TAAAGAAAC-3' と NcoI プライマーで増幅)、LS3 (5'-AAGCTTGTCTGAGGATTTctgcagA ATAAAGAAACGAGGTAG-3' と NcoI プライマーで増幅)、LS4 (5'- AAGCTTGTCTGAGGATT TTACAGTctgcagGAAACGAGGTAGCCCAAA-3' と NcoI プライマーで増幅)、LS5 (5'-AAGC TTGTCTGAGGATTTTACAGTAATAAActgcagAGGTAGCCCAAACAAG-3' と NcoI プライマーで増幅) を作製した。

【0024】

(方法2) PL1を鋳型としてLA-Taqポリメラーゼ(宝)を用いるinverse PCR法により、PL2 (5'-TCAATGGGACACGCTGCCTGACCACCATGT-3' と pUC19 プライマー: 5'-G GCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTG-3' で増幅)、PL6 (5'-TGTCGGTGCAAAAAATGAAAC CCCAACTT-3' と pUC19 プライマーで増幅)、PL7 (5'-AATGTTTATCCCTTGACACATTTT ACATC-3' と pUC19 プライマーで増幅)、PL8 (5'-GCAAAACATCACAACCTCTAGAAAC-3' と pUC19 プライマーで増幅)、PL4C (5'-GTTTGGCTGCAGTCGTTTCTTTATTACTGTAAATC CTC-3' と 5'-CAATACTGCAGTATATGTTATGATATAATATGATGCAGC-3') を増幅した。増幅した断片を平滑末端化し、セルフライゲーションした。

【0025】

(方法3) Pra2-35S90LUC (GF) プラスミドを構築するためには、pra2上流領域を各々EcoRV認識配列とPstI認識配列を含む2つのプライマーでPfu DNA Polymeraseを用いて増幅した。増幅されたDNA断片をpZEr0-2.1 (Invitrogen) のEcoRV部位にサブクローニングし、EcoRVとPstIで消化した。回収したEcoRV-PstI断片をpBI221-LUC+のEcoR-PstIサイトにサブクローニングした。5種類の長さの異なるDNA断片を増幅した。すなわち、GF1 (GFプライマー: 5'-TACTGCAGAAAAGTA ACACATATTT-3' と 5'-TGGTGATATTGTTTAGATATCATATTATTGC-3' で増幅)、GF2 (GFプライマーと 5'-ATGATATCCAAGGGATTTGGAAAT-3' で増幅)、GF3 (GFプライマーと 5'-GTGATATCGGGATAAACATTTTAAGG-3' で増幅)、GF4 (GFプライマーと 5'-TTGATATCCCGACAA AGATCACAC-3' で増幅)、GF5 (GFプライマーと 5'-GGGATATCTCGTTTCTTTATTACT-3' で増幅) とした。

【0026】



(方法4) PL4Bを作製するために、各々HindIII認識配列とPstI認識配列を5'側に持つ2種のプライマーとPfu DNA Polymeraseを用いて、pra2上流領域を増幅した。増幅されたDNA断片をHindIIIとPstIで消化後、pZEr0-2.1のHindIII-PstI部位にサブクローニングし、配列を確認後、またHindIIIとPstIで消化した。この断片をLUC遺伝子をもつLS5のHindIII-PstIサイトにサブクローニングした。

【0027】

#### 実施例4. 欠失クローンのプロモーター活性解析

実施例3に記載の(方法1)および(方法2)で、Pra2遺伝子の5'上流領域を5'側から順次欠失させたPL1からPL8までの8種の欠失クローンを作製した(図3a)。これらの欠失クローンを実施例2で述べた方法によりエンドウ茎伸張部位にパーティクルガンで導入し、暗条件、明条件で茎伸張部位のルシフェラーゼ活性を測定した。PL1からPL4の4つの欠失クローンでは暗所におけるルシフェラーゼの発現レベルが同程度であり、光によるルシフェラーゼ活性の抑制も観察された(図3b)。しかしPL5からPL8では暗所での発現レベルが大幅に低下し、光による発現抑制も見られなくなった(図3b)。この結果はPL4からPL5の間にある93bpの領域に光応答に関わるシスエレメントが存在することを示している。各欠失クローンにおける暗条件と明条件でのルシフェラーゼ活性の比(D/L比)も、PL4とPL5で劇的に変化しており(図3c)、93bp領域に光応答領域が存在すること、すなわち該93bpからなる配列番号2に記載した配列を有するDNA断片が、光によって発現が抑制される機能に関わるシスエレメントであることを示している。PL7におけるルシフェラーゼ発現レベルの回復は、-593 bpから-292 bpの間に発現レベルを抑制するリプレッサーが、-291 bpから-101 bpの間に発現レベルを上昇させるエンハンサーが存在することを示唆している。

【0028】

#### 実施例5. 他のプロモーターとの組み合わせ効果

この93bpの光抑制性シスエレメントが、他のプロモーターに光応答性を付与できるか、すなわち光抑制性シスエレメントと他のプロモーターを組み合わせた場合に、該プロモーターが光抑制性プロモーターとしての機能を発揮するかどうかを調べた。異なった長さに3'側を欠失したpra2遺伝子の5'上流領域を、カリフラ

ワーモザイクウイルス35S (CaMV35S90) プロモーターに融合し、5種類のクローンを実施例3の(方法3)に記載した方法で作製した(図4a)。-24から+196まで欠失したGF1では光応答性が確認されなかったが、-101から+196まで欠失したGF2では光応答性が見られた(図4b)。これは-101から-25の領域に存在するシスエレメントとCaMV35S90プロモーター中のas-1エレメントとの相互作用の結果だと考えられる。その他のGF3、GF4および93bp光抑制性シスエレメントのみのGF5では、全てにおいて光応答性が認められた(図4b)。これらの結果は、93bpの光抑制性シスエレメントが、異種プロモーターであるCaMV35S90プロモーターに光抑制性を付与するのに十分であることを示している。

#### 【0029】

#### 実施例6. フィトクロム応答エレメントの解析

pra2遺伝子の発現は光受容体であるフィトクロムにより制御されている。そこで、93bp光抑制性シスエレメント中にフィトクロム応答性シスエレメントがあるか調べた。まず、93bp光抑制性シスエレメントを含むPL4と含まないPL5について調べた(図5a)。暗条件下のサンプルは遺伝子導入後12時間、暗条件下に置いた。赤色光処理のサンプルは遺伝子導入後2分間赤色光処理し、その後12時間暗条件下に置いた。赤色光/近赤外光処理のサンプルは2分間の赤色光処理後5分間の近赤外光処理をし、その後12時間暗条件下に置いた。その結果、PL4では赤色光によるルシフェラーゼの発現抑制と近赤外光による回復が認められたが、PL5では赤色光による発現抑制が全く見られなかった(図5b)。93bp光抑制性シスエレメントだけでpra2プロモーターにフィトクロム応答性を付与できるか調べるため、該シスエレメントをpra2遺伝子上流領域のTATAbox及び5'-非翻訳領域に融合したクローンを作製した(図5a中のPL4C)。その結果、発現レベルは大幅に下がったが、該シスエレメントだけでフィトクロム応答性を付与できることが示された(図5b)。さらに詳細に解析するため、PL4とPL5の間に欠失を持つPL4Aを作製した(図5a)。その結果PL4に比べ発現レベルは下がったものの、フィトクロム応答性は維持されていた(図5b)。さらに、31bp領域(-672 bpから-642 bp)中の24bpを内部欠失したコンストラクト(PL4B)を作製・検討したところ、フィトクロム応答性が見られなくなった(図5a及び5b)。これらの結果は-672 bpから-64

2 bpの31bpの領域にフィトクロム応答性シスエレメントが存在することを示している。同時に、-734から-673の62bpの領域に発現レベルに影響するシスエレメントが存在することも示唆された。

#### 【0030】

##### 実施例 7. リンカー・スキャン法による12bpコア配列の決定

赤色光によるレポーター遺伝子の発現抑制に関わるシスエレメント中のコア配列を決定するため、上記31bp領域をリンカー・スキャン法により調べた。異なった位置に6bpの塩基置換を持つ5つのDNA断片を作製した（図6a）。暗条件下および赤色光処理の条件は、実施例 6 に記載の条件と同じであった。その結果LS2とLS3ので赤色光応答性が見られなくなった（図6b）。特に、LS3では光応答性が全く見られなくなり、LS3でリンカーが挿入された領域にコア配列が存在することが示された。LS3以外のクローンでは光応答性は認められた。これらの結果は、フィトクロム応答性のシスエレメント中に、12bpのコア配列（5'-GGATTTTACAGT-3'）が存在することを示している。この12bpのコア配列は、これまでに報告されている光もしくはフィトクロム応答性シスエレメントの中には存在しないことから、フィトクロム応答性シスエレメントの新しいコア配列である。

#### 【0031】

##### 実施例 8. ゲルシフト法による12bpコア配列に結合する因子の検出

12bpコア配列に特異的に結合する核内因子が存在するか調べるため、エンドウ上胚軸核抽出液を用いてゲルシフト・アッセイを行った。核抽出液は暗所生育（6日間）エンドウと、核を抽出する前に6時間光処理したエンドウ（光処理サンプル）からそれぞれ準備した。核抽出液は、石黒らの方法にしたがって調製した（Ishiguro et al. 1992）。先端から1 cmの茎を細かく切り、250 mlの懸濁緩衝液（10 mM PIPES-KOH [pH7.0]、1 M ヘキシレングリコール、10 mM 塩化マグネシウム、5 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール、1 mM フェニルメチルスルフォニルフロライド（PMSF）、8  $\mu$ M ペプスタチンA、2.4  $\mu$ M ロイペプチン）中でホモジナイズした。ホモジナイズ液をろ過後、核を2,700 x g、15分間の遠心分離により沈殿させ、50 mlの洗浄緩衝液（50 mM Tris-HCl [pH7.5]、10 mM 塩化マグネシウム、20 %グリセロール、5 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール）に懸濁し、5,200 x g、

15分遠心した。この操作を3回繰り返した。沈殿を3 mlの核溶解緩衝液 (15 mM PIPES-KOH [pH7.5], 1.25 M 塩化カリウム、5 mM塩化マグネシウム、2.5 mMデチオスレオトル、1 mMフェニルメチルスルフォニルフロライド、8  $\mu$ M ペプスタチンA、2.4  $\mu$ Mロイペプチン) に溶解した。不溶物を5,200 x gで15分間遠心して除き、さらに100,000 x gで1時間遠心した。上清を透析し、さらに12,000 x gで15分間遠心し、上清を回収して-80℃で保存した。

### 【0032】

ゲルシフトアッセイは志水らの方法に依った (Shimizu et al. 1996 Plant Mol. Biol. 31: 13-22)。合成プライマーは、-672 bpから-642 bpの31bp領域と同じ配列を持つ合成DNA (WT1) を用い、末端を<sup>32</sup>P-ATPで標識した (図7a)。

WT1 5'-GTCTGAGGATTTTACAGTAATAAAGAAACGA-3'

WT2 5'-TCGTTTCTTTATTACTGTAAAAATCCTCAGAC-3'

標識したWT1と合成DNA (WT2) をハイブリダイズした。これに対し、8  $\mu$ gの核抽出液を20  $\mu$ lの結合緩衝液 (20 mM Tris-HCl [pH8.0]、50 mM 塩化カリウム、0.5 mM EDTA、15 mM 塩化マグネシウム、10 %グリセロール、1 mMデチオスレオトル、2  $\mu$ g poly [dI-dC]-poly[dI-dC]) 中に加えると、DNA-タンパク質複合体が形成したことを示すバンドが検出された (図7b)。光処理したサンプルではこのバンドが明らかに薄いことが示された。このDNA-タンパク質複合体のバンドが12bpコア配列に特異的に結合しタンパク質によるものか調べるため、12bpコア配列中のアデニンをシトシンに置換した変異DNA (MT1とMT2のハイブリダイズしたもの) を作製した (図7a)。

MT1 5'-GTCTGAGGCTTTTCCCGTAATAAAGAAACGA-3'

MT2 5'-TCGTTTCTTTATTACGGGAAAAGCCTCAGAC-3'

50倍量の非標識DNA (WT1とWT2をハイブリダイズしたもの) の添加によりバンドはほとんど消失したが、50倍、200倍もしくは400倍のコンペティター (MT1とMT2をハイブリダイズしたもの) を加えてもDNA-タンパク質複合体が形成したことを示すバンドの濃さはほとんど変わらなかった (図7b)。これらの結果は、検出されたバンドは12bpコア配列と特異的に結合する核内因子との複合体であることを示している。

【0 0 3 3】

【発明の効果】

以上述べてきたように、本発明によって光抑制性のプロモーター配列、該プロモーター中に存在する93塩基対からなる光抑制性のシスエレメントの配列、及び該シスエレメント中に存在する12塩基対からなるコア配列が開示され、これらの塩基配列を有するDNA断片を用いて、植物細胞もしくは植物体において目的遺伝子を光抑制的に、ないしは暗所で特異的に、発現させることができる。

【0 0 3 4】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SUNTORY LIMITED

<120> Light Repressible Promoter

<130> 990410

<160> 3

<210> 1

<211> 12

<212> DNA

<213> *Pisum sativum* cv. Alaska

<223> Nucleotide sequence for a core region of light repressible promoter from the pea small GTPase gene

<400> 1

ggattttaca gt

12

【0 0 3 5】

<210> 2

<211> 93

<212> DNA

<213> *Pisum sativum* cv. Alaska

<223> Nucleotide sequence for a cis element of light repressible promoter from the pea small GTPase gene

<400> 2

aaaagtaaca catatittga taaatttatt actaaaacta ttttctagta cttgttaatc 60  
atgtctgagg attttacagt aataaagaaa cga 93

[ 0 0 3 6 ]

<210> 3

<211> 2325

<212> DNA

<213> pisum sativum cv. Alaska

<223> Nucleotide sequence for a light repressible promoter from the pea small GTPase gene

<400> 3

aagctttaaa ggcaaggga agacaacaat tccaaaaata taaaaactcc taaagaatga 60  
ttttattctt atcttcataa ataacttttc ctattccaaa aacacatcaa agttatgtga 120  
ttcatatctt taattatctg ataatatata attgtatatt caatatttca tacaattgtg 180  
ttatatgaaa tattttgtag gtaaaaggga ctaagaataa cctccgcaac atcaaagtca 240  
gaaacctctt gtaactcttc agttgaaacg agaaggaagt ggacaacaca gaaaactaag 300  
ttccccact taacttcttg gtttgggtga ggacttcctt tacaatttat actctaagga 360  
aatacattag acactctaga tgggttgcac tagctcatat atttttaagt aataataccc 420  
acttcaagtt ttttgTTTT tgttgtgtg cagtagatga taagatggat catttctcaa 480  
ggcccttatg caaagacata agatccatat actccaccaa gattgcttta catctaacca 540  
agttaatgaa tttaaattct tcgaaacaat tatttcctac caaaggaagt ttatatgcac 600  
attttctaata gtatttttat atagaattga tacatgttgc tgttatacaa gattagaatt 660  
tggatttctc atccaaactc ctacacttgg tgagaaattt cagcctcaac ctcagtaaata 720  
caggttcctc ctccaaactc atacacttgg ttgagtgaga attatggacg tcaacctagc 780  
aatatgaatc cctctccaag atcctacact tatctgagtg agaattttgg tcctcgacct 840  
caacaagata gatttgatgg gtcacacga ggggaagcat tcacattggg tcaaagattc 900  
acccaaacaa gtgagagaga catcacatat caacaaaaac ctttaagggtga taggtgtatg 960

agttctctta cttataaagt gctcaacctc cacttttcta agcaatgtgt gacttagaac 1020  
 tcacacttat ttctcaacat aactcacact tgtttatcaa caatctcccc cacaagtgtg 1080  
 agttcattcg ctatgtcccc ctcaagtgga atctctttca tccgcatgct tataccgttg 1140  
 ttgacataca tctttactcg tcatgggcac ttcaatggga cacgctgcct gaccaccatg 1200  
 tcaagaagac ttttgacaca aggagtcggt cccttactcg aaccagactc tgataccatt 1260  
 aatagatcac tttgaatgga tatcattcat actatatcaa acatttacgt aaagataaaa 1320  
 aattcaccca aacaaatgag agagacacta catctctctt attatattaa taaaatgtaa 1380  
 agaaaaatat agtataaaag taacacatat ttgataaat ttattactaa aactattttc 1440  
 tagtacttgt taatcatgtc tgaggatttt acagtaataa agaaacgagg tagcccaaac 1500  
 aaaagtgata attgtggagg gtgtgatctt tgtcggtgca aaaaatgaaa ccccaaactt 1560  
 gtgatattgt gtcgactgct ccgtcgctac attgaaatta atgaatgttc ttttataacg 1620  
 tttgtctatg ccgtattacc catatgggtca ctagaatggg acaatgaatt taatatatat 1680  
 ctgtcatgtg tgggtggatt caatttaatt gtatcgtaaa tggtaggaca tactcatgct 1740  
 acacaattat atcatcactg gtcaatcact ggtcaatgtg ttttctcttc ccatgaattc 1800  
 acattgctaa agaaaattac caccctaaaa tgtttatccc ttgcacacat ttcacatcaa 1860  
 tttattaaaa cattttacca ttggaaaaca catacatatt caatcaatta tttttgcatt 1920  
 ttcaaaaact aaaccaaaca aacttagaat attttgtaat tatagcacia ttttcaaaaa 1980  
 tatectagtc ttcaaccact caataattca caatttccaa atcccttgca aaacatcaca 2040  
 acctctagaa actttgatta ataatctaata aaaagcaata atatgatatc taaacaatat 2100  
 caccatatat gttatgatat aatatgatgc agcaatacac ttaatttggt aaagcattaa 2160  
 agcgagacaa ctctattaac accggttaatt caacaaccgt tgttgtcgag ttcattgttt 2220  
 ctccaactc ttttcctttt cctttacttt atttatttct cctacttacc ttttctacta 2280  
 atatatacta tctctcttga acctcttttt gatcttgaca agaaa 2325

## 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

図 1 は、pra2染色体遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列を示す図で、塩基配

列番号は転写開始点（↓で示す）を0として右側に、アミノ酸配列番号は左側に示した。矢頭はエキソンとイントロンの境界を示し、113塩基対の逆方向相同配列は対向する矢印で示した。93塩基対のシスエレメントおよびTATA BOXはボックスで囲み、13塩基対のコア配列は網掛けにした。

### 【図2】

図2は、pra2プロモーターによるレポーター遺伝子の発現が光によって抑制されることを示す図で、Dは暗条件下に、Lは光条件下に12時間置いた後のレポーター遺伝子（グルクロニダーゼ）の発現量を示す。a)の左側は黄化茎の成長部分に、右側は成長部分の切片に金粒子を打ち込んだ場合を示し、b)は、黄化茎の各部位でのレポーター遺伝子の発現量を示す。

### 【図3】

図3はpra2プロモーター欠失変異解析の結果を示す図で、a)はpra2プロモーターの欠失クローンの構成を示しており、図中、5'UTRはpra2遺伝子mRNAの5'-非翻訳領域を、LUCはルシフェラーゼ遺伝子を、NOSはノパリンシンターゼ遺伝子のターミネーターを示す。b)は、a)に示した構成の欠失クローンをエンドウ黄化茎に打ち込んで12時間後のレポーター遺伝子の発現量を示す図で、Dは暗条件下に、Lは光条件下に置いた場合を表す、c)は、b)でのレポーター遺伝子の発現を暗条件下と光条件下の比で表したものである。

### 【図4】

図4はカリフラワーモザイクウイルス由来35Sプロモーターと組み合わせた場合のプロモーター活性を示す図であり、a)は、pra2プロモーターの欠失クローンの構成を示す図で、93bpのシスエレメントは白棒で、それ以外のプロモーター部位は黒棒で表す。5'UTRはpra2遺伝子mRNAの5'-非翻訳領域を、35S90はカリフラワーモザイクウイルス由来35Sプロモーターを、LUCはルシフェラーゼ遺伝子を、NOSはノパリンシンターゼ遺伝子のターミネーターを示す。b)はa)に示した構成の欠失クローンをエンドウ黄化茎に打ち込んで12時間後のレポーター遺伝子の発現量を示す図で、Dは暗条件下に、Lは光条件下に置いた場合を表す。

### 【図5】

図5は光抑制性シスエレメントを解析した結果を示す図であり、a)はpra2プロ



モーターの欠失クローンの構成を示す図で、93bpのシスエレメントは白棒で、それ以外のプロモーター部位は黒棒で表す。5'UTRはpra2遺伝子mRNAの5'-非翻訳領域を、LUCはルシフェラーゼ遺伝子を、NOSはノパリンシンターゼ遺伝子のターミネーターを示す。b)はa)に示した構成の欠失クローンをエンドウ黄化茎に打ち込んで12時間後のレポーター遺伝子の発現量を示す図で、Dは暗条件下を、Rは赤色光を2分間照射した後暗条件下に置いた場合を、R/Fは赤色光を5分間照射しその後2分間赤外線を照射した後暗条件下に置いた場合を示す。

#### 【図6】

図6はコア配列のリンカースキャニング解析の結果を示す図であり、a)は、図5に記載したPL4Aの構成のなかで、コア配列近傍の野生型および変異型の塩基配列を示し、小文字の部分は野生型から変異した塩基を示す。b)はa)に示した構成の欠失クローンをエンドウ黄化茎に打ち込んで12時間後のレポーター遺伝子の発現量を示す図で、Dは暗条件下に、Rは赤色光を2分間照射した後12時間暗条件下に置いた場合を示す。

#### 【図7】

図7はゲルシフトアッセイの結果を示す図で、a)は実験に用いた合成DNAの配列を示し、WTは野生型の、MTは変異型の配列を表す、b)はゲルシフトアッセイの結果を示す図で、図中、Dは暗所で生育させた、Lは6時間光照射したエンドウ上胚軸から調製した各抽出液を添加したことを示す。矢印は合成DNAとタンパク質の複合体の電気泳動位置を示す。

## 【書類名】 図面

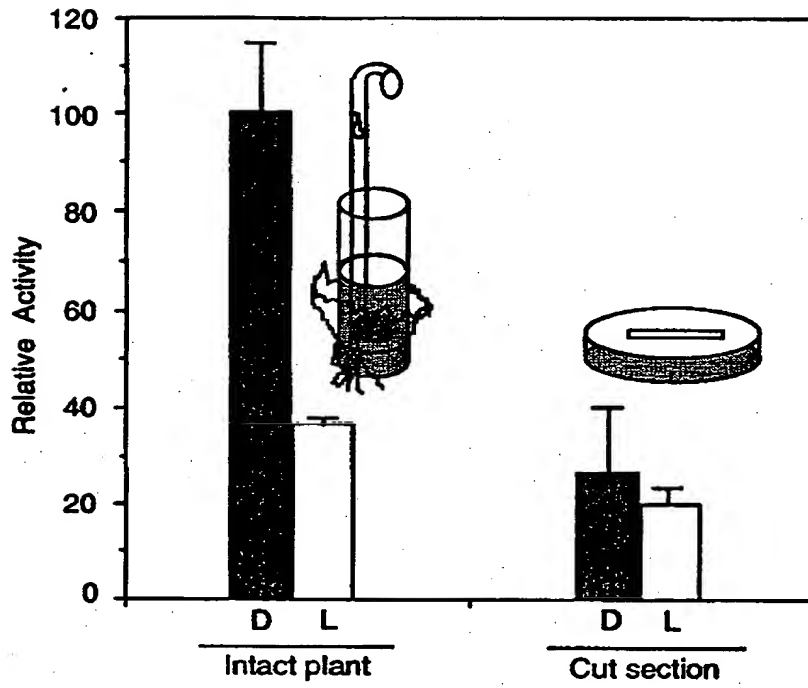
## 【図 1】

AAGCTTTAAAGCAAGGAAAGACAACAAATCCAAAAATATAAAAACTCTAAAGAATGATTTTATCTTATCTCAATAAACTTTTC -2040  
 CTATTCAAAAACACATCAAAAGTTATGTGATTCATATCTTAATATCTGATAATATATAATTGTATATTCATATTCATACAAATTGTG -1950  
 TTAATGAAATATTTTGTAGGTAAAGGGACTAAGAATAACCTCCGCAACATCAAAAGTCAGAAACCTCTGTAACTCTTCAGTTGAAACG -1860  
 AGAAGGAAGTGGACAACAGAAAACTAAGTCTCCCACTTAACCTCTTGGTTGGGTGAGGACTTCTTACAATTTATCTCTAAGGA -1770  
 AATACATTAGACACTCTAGATGGGTGATAGTCTATATTTTAAGTAATAATACCACTCAAGTTTGTGTTTTGTGTTGTG -1680  
 CAGTAGATGATAAGATGGATCATTTCTCAAGGCCCTTATGCAAGACATAAGATCCATATCTCCCAAGATTGCTTTACATCTAACCA -1590  
 AGTTAATGAATTAATTTCTGGAACAAATATTTCTCAACCAAGGAAGTTATATGACATTTTCTAATGTATTTTATATAGAAATGA -1500  
 TACATGTTCTGTTATACAGATTAGAATTTGATTTCTCATCTCAAACTCTACACTTGGTGAGAAATTCAGCCTCAACCTCAGTAAAT -1410  
 CAGGTTCTCTCTCAAACTCATACACTTGGTGGAGTGAAGATTATGGACGTCAACTAGCAATATGAATCCCTCTCCAGATCTTACACT -1320  
 TATCTGAGTGAGAAATTTGGTCTGACCTCAACAGATAGATTGATGGTCTACGAGGGGAAGCATTACATTGGGTCAAGATTC -1230  
 ACCCAACAAAGTGAGAGAGACATCATATTAACCAAACTTAAGGTGATAGGTGATGAGTCTCTTACTATAAAGTCTCAACCTC -1140  
 CACTTTTCAAGCAATGTGTGACTTAGAATCTCACACTATTTCTCAACATAACTCACACTTGTATCAACAACTCTCCCAAGTGTG -1050  
 AGTTCATCTGCTATGTCCTCCCAAGTGGAACTCTCTTCATCCGATGCTTATACGTTGTGACATACATCTTACTGCTCATGGGCAC -960  
 TTCAATGGGACACGCTGCTGACCACTATGTCAGGAAGACTTTTGACACAAGGAGTGGTCCCTTACTCGAACCAAGTCTGATACCAAT -870  
 AATAGATCACTTTGAATGGATATCATTCATATATCAAACTTACGTAAGATAAAAAATTCACCAACCAATGAGAGAGACACTA -780  
 CATCTCTCTTATTATATAATAAAATGTAAGAAAAATATAGTATTAAGTAACACATATTTGATAAATTTATTAACAACTATTTTG -690  
 12bp element  
 TAGTACTTGTATATCATGTCTGAGGATTTTACAGTAATAAAGAAACGAGTAGCCCAACAAAGTGATAATTGTGGAGGTGTGATCTT -600  
 TGTGGTGCAAAAATGAAACCCCAAACTTGTGATATGTGCTGACTGCTCCGTCGCTACATTTGAAATTAATGAATGCTCTTTATAACG -510  
 TTTGTCTATGCGGTATTACCATATGGTCACTAGATGGGACAATGAATTAATATATCTGTGCTGTTGGGTGGATTCAATTTAATT -420  
 GTATCTGAATGGTAGGACATCTCATGTACACAATTATATCATCTGGTCAATCACTGGTCAATGTGTTTCTCTTCCATGAATTC -330  
 ACATTGCTAAAGAAAATACCACTTAAATGTTTATCCCTTGCACACATTTCACATCAATTTATTAACCAATTTTACCATTGGAAACA -240  
 CATACATATTCATCAATTAATTTTTCATTTTCAAACTTAACCAACAACTTAGAATATTTGTAATATAGCACAAATTTCAAAA -150  
 TATCTAGTCTTCAACCACTCAATAATTCACAATTTTCAATCCCTTCAAAACATCACAACTCTAGAACTTTGATTAAATATCTAAT -60  
 TATA box transcriptional start site  
 AAAAGCAATAATATGATATCAAAATATCACATATATGTTATGATATAATATGATGAGCAATACACTTAATTTGGTAAAGCATTA -31  
 AGCGAGACAACTCTATTAAACCCGGTAATTCACCAACGGTTGTGCTGAGTTCATGTTTCTTCCAACTCTTTCTCTTCTTACCTT -121  
 ATTTATTTCTCTACTTACCTTTTCTACTAATATATCTATCTCTTGAACCTCTTTTGTGCTTGCAGAAAGTGAACCAAGAAATG -211  
 1 M N Q E M  
 AATGGAGTAGAAGCTGAAAGCTCAAGAAAAATAGATTATGTGTTAAGTTGTGCTGATTTGGTATCTGCAGTAGGAAAACTCAA -381  
 6 N G V E A E K L Q E K I D Y V F K V V V I G D S A V G K T Q  
 ATATTGCTGGAGTTTACAAAGAAAGTGTGTTTCTGACTCAAAATCAACCATTTGGTGTGAGTTTCAAACTAAACTGTCACTATTAAT -391  
 36 I L S R F T K N E F C F D S K S T I G V E F Q T K T V T I N  
 GGTAAACTCATCAAGCTCAGATCTGGGATCTGCTGGCAAGAAAGTTCTTTCTCTCTCTCTATAATCTCGAATATATATTTTACT -481  
 66 G K L I K A Q I W D T A G Q E R  
 TACATTTGTGGGAATAACATCTGCATCTGCATCTGAATCTCTGCAACCCGACATCTCAAAAAAATGTGCTGTGTCACAGATACTA -571  
 TGATTATGTCTGATTTATTTTTCAGGTATAGAGCGGTGACAAGTGCATCTATAGAGGAGCATTAGGGCCCATGCTAGTCTACGACA -661  
 82 Y R A V T S A Y Y R G A L G A M L V Y D I  
 TAACTAAGAGACAACATTTGATCATGTTGCTAGATGGGTGAGGAACCTGAGATCACAGCTGACGGTTCGATGCTCATGTTAATTG -751  
 183 T K R Q T F D H V A R N V E E L R S H A D G S I V I M L I G  
 GTAACAAAGGTGATCTTGTGACCAAGAGGTGACAGACTGAAGATCGGTTGAGTTTGCAGAGGATCAGGGTCTCTTTTCTCAGAAA -841  
 133 N K G D L V D Q R G V Q T E D A V E F A E D Q G L F F S E T  
 CTTCTGCTTTTGAAGAAATGGAATCTGCTTCTCAAGTTGCTTCAAGAGATTAAAGTTGTTTCTAAAGGCTCTTGGAAAT -931  
 163 S A F S G E N V N S A F L K L L Q E I N K V V S K R S L E C  
 GTAATAATGGGATTAAGGAAATGGAATCATGATGTTGCAGCACTTAAAGGGGAGAAATGATATAATTCAGCTCTGAAATGGAAA -1021  
 193 N N G I K G N G N H D V A A L K G E K I D I S A S E L E I  
 TTAGTGAATCAAGAAATGCAATTCATGTTCTTGTGATCTAAACAGAGTCAAAAGTATATATTACAAAAAAATCAATCAATGTGA -1111  
 223 S E I X K L N S C S C  
 TCAGAATTGAAGAGCTTTTACTTATTTTGTGTTCTGTTGGGTGAATTACAGTAATGATTTTACATTTTATAGATCTAATCTTCT -1201  
 CCTGTATCTTTTATTTAAGATTTTATATTGAGGTAAATTTGTTGTCTAGTTGTTGTCTAATATATTTTAAATTTTAAAGCTT -1291  
 GATATCGAATCTCTGACGCC

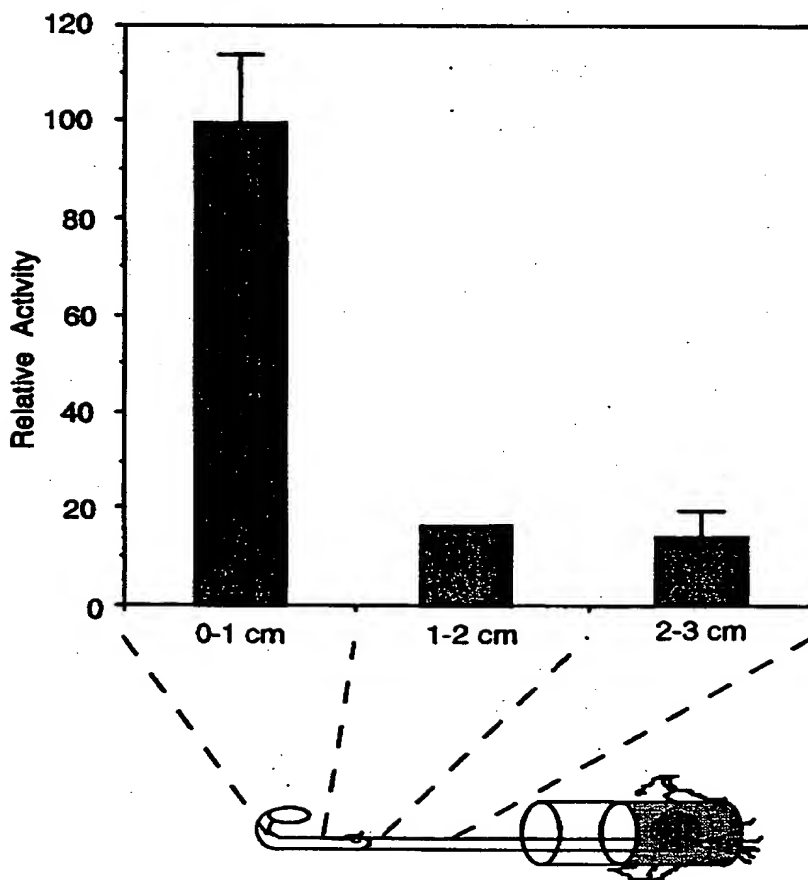
1312

【図 2】

a)

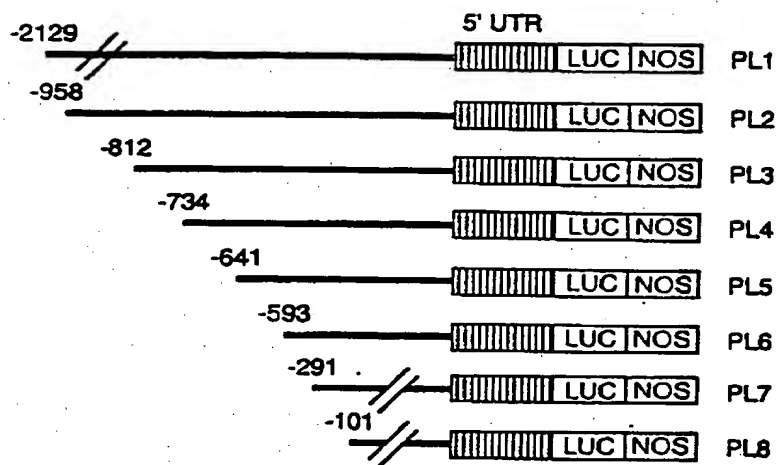


b)

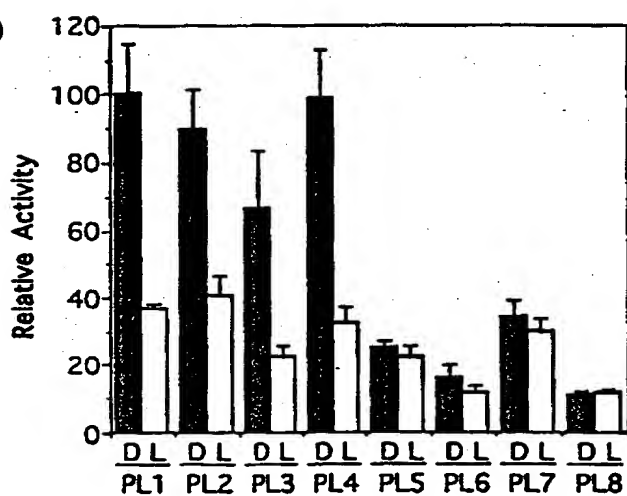


【図 3】

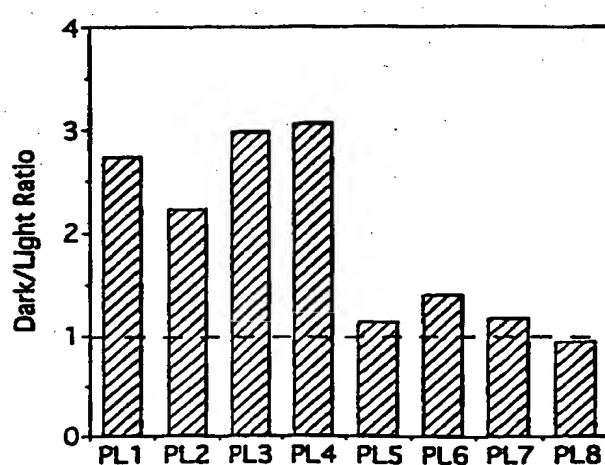
a)



b)

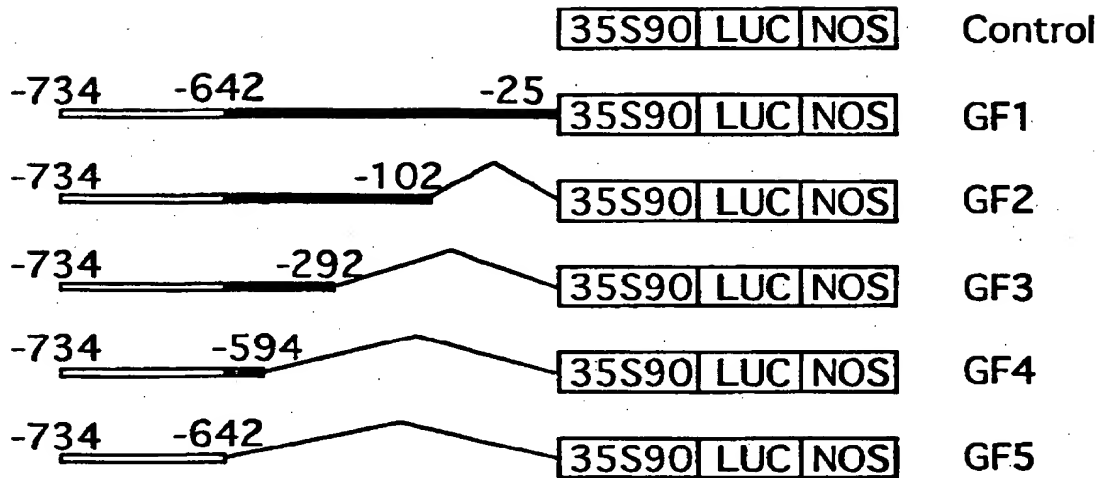


c)

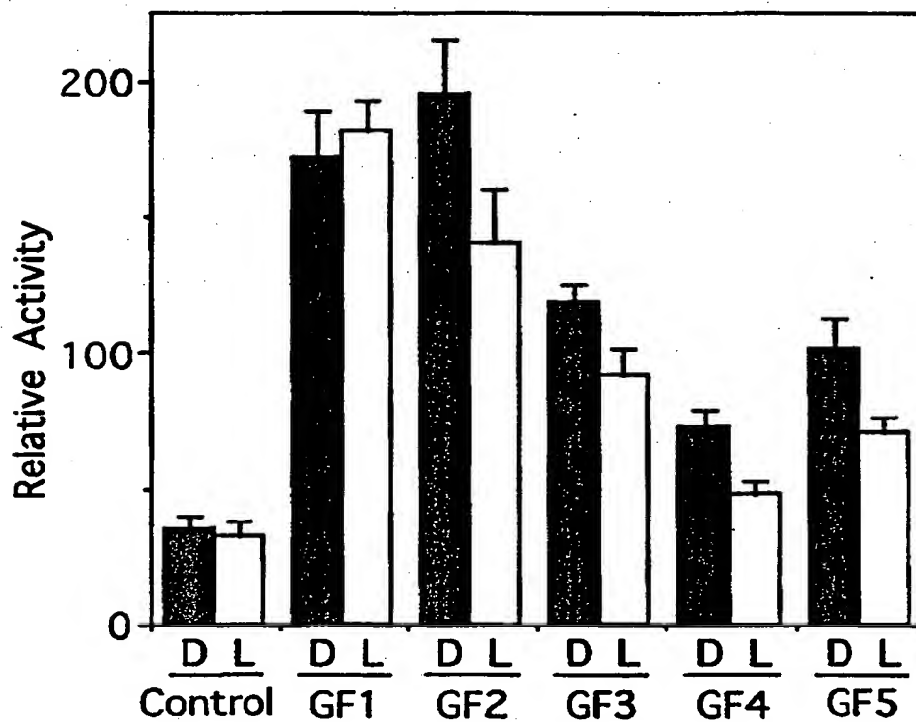


【図 4】

a)

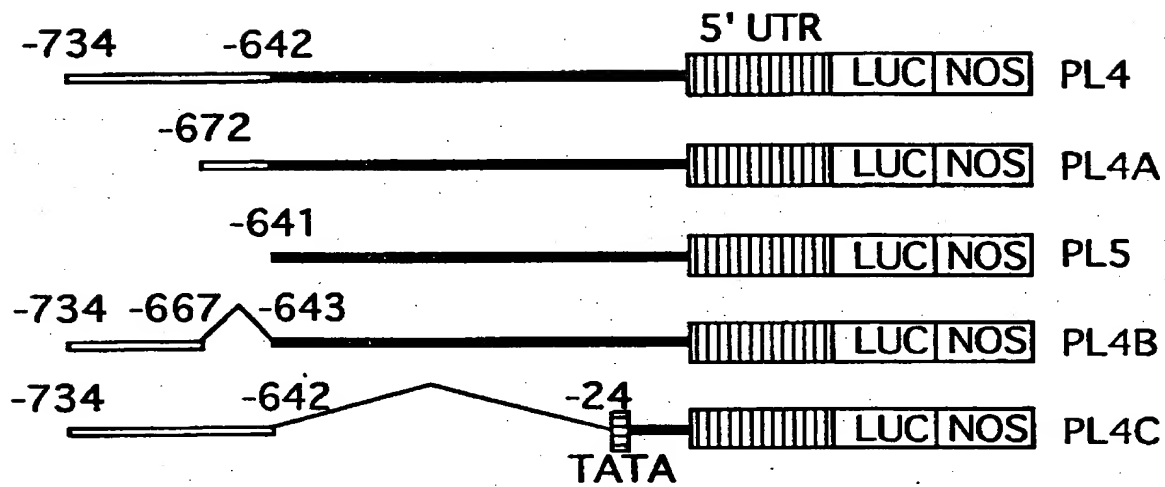


b)

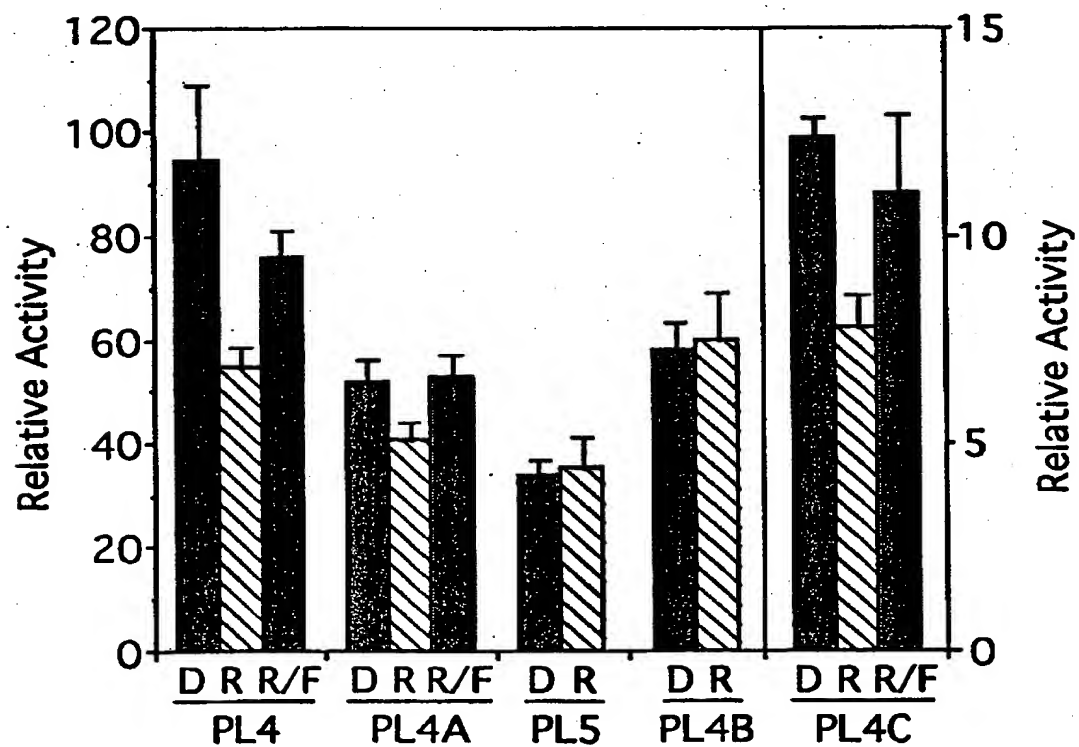


【図 5】

a)



b)



【図 6】

a)

-672                      12bp element                      -642

■                      ■

GTCTGAGGATTTACAGTAATAAAGAAACGA WT

cTgcagGGATTTACAGTAATAAAGAAACGA LS1

GTCTGactgcagTACAGTAATAAAGAAACGA LS2

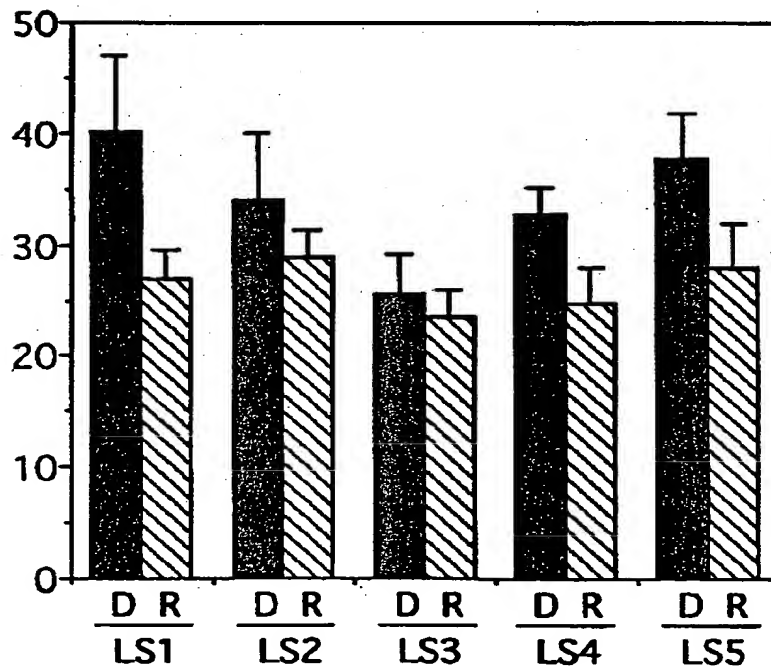
GTCTGAGGATTTctgcagAATAAAGAAACGA LS3

GTCTGAGGATTTACAGTctgcAgGAAACGA LS4

GTCTGAGGATTTACAGTAATAAactgcaGA LS5

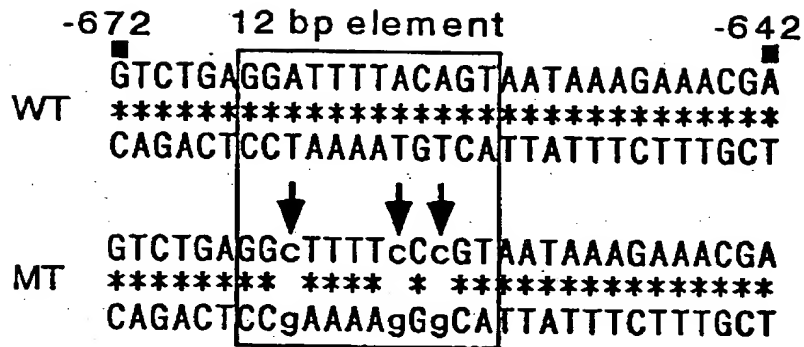
b)

Relative Activity



【図 7】

a)



b)

Competitor	WT	MT
(fold)	50 50 50 50 200 400	
Nuclear Extract	D L D L D L D D	



Lane No. 1 2 3 4 5 6 7 8 9



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 光抑制的に、ないしは暗所で特異的に、目的遺伝子を発現させるためのDNA断片もしくはプロモーター。

【解決手段】 光抑制的ないしは暗所で特異的に発現している植物遺伝子の5'-非翻訳領域から光抑制性プロモーターを取得し、該プロモーターの機能を詳細に解析して光抑制的発現に関わるシスエレメント配列およびコア配列を明らかにした。これらの配列を含むDNA断片を目的遺伝子上流に設置した発現カセットを作製し、該発現カセットで植物細胞もしくは植物体に導入して、目的遺伝子が光抑制的にないしは暗所で特異的に発現する植物細胞もしくは植物体を得ることができる。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000001904]

1. 変更年月日 1990年 8月13日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

氏 名 サントリー株式会社